Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

R 4228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

VOL. 6

1977

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-7

Première Partie

BILAN SCIENTIFIQUE

INTRODUCTION

L'année 1977 aura été sans doute la plus critique en ce qui concerne les moyens matériels et humains : d'une part, le budget initialement prévu en fonctionnement n'a pas été versé, aucune attribution d'équipement n'a été enregistrée depuis 2 ans, et d'autre part, le remplacement du poste 5B (rendu vacant par le décès de la personne qui l'occupait) a entraîné tous les problèmes inhérents au recrutement et à la nécessité d'une réorganisation complète du travail.

Au bilan de l'activité du Laboratoire figurent, cependant, les résultats d'expériences nouvelles (comparaison des paramètres phosphatasiques intestinaux chez plusieurs races d'Abeilles), ceux du dépouillement de travaux antérieurs (publications sur les glucosidases et la glycémie) ainsi que de leurs prolongements théoriques (calcul des cinétiques enzymatiques) ; enfin, le 2e semestre a vu la reprise de l'importante activité bibliographique entreprise au cours des années précédentes : quelques données numériques fourniront un aperçu du résultat, ainsi que de l'accueil réservé aux publications récentes du Laboratoire.

Il apparaît maintenant, avec certitude, que les années 1977-78 marqueront une étape décisive dans l'orientation à long terme des programmes : aussi, l'exposé des résultats sera-t-il suivi, cette année, d'une discussion plus développée, étayée de données bibliographiques importantes, destinée à exposer les principaux arguments ayant motivé les propositions de programmes formulées dans les D.O.R. 1977 et dans les récents rapports (commission de biochimie).

La deuxième partie du compte rendu sera consacrée, comme à l'accoutumée, aux questions budgétaires.

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

Vol. 6 (1977)

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Première Partie : BILAN SCIENTIFIQUE.

I- SPECTRE DE PROTEINES ET PHOSPHATASES ALCALINES DANS L'INTESTIN DE 3 RACES D' ABEILLES. a) Spectre protéïque.....02
b) Phosphatases alcalines.

II- DETERMINATION RIGOUREUSE DES PARAMETRES CINETIQUES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES.
a) Position du problème.....02
b) Solution Empirique.
c) Solution Logique.

III- INHIBITION DE TYPE " n " DES α-GLUCOSIDASES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLES PAR LE GLUCOSE.....06

IV- RELATIONS INTRA-GLYCEMIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'ABEILLE NOIRE.....07

V- EFFETS COMPARES DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE DEHYDRO-ASCORBIQUE SUR L'AMINO-ACIDEMIE DE *LASPEREYSIA POMONELLA*.....08

VI- ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA COCCINELLE APHIDIPHAGE *SEMIADALIA UNDECEMNOTATA*...08

VII- DIVERS (Services rendus).....08

VIII- DISCUSSION ET PROJETS.....09

1º Les Glucosidases.
2º Le Métabolisme lipidique (Projets).
3º Les Phosphatases alcalines.

IX- ACTIVITES BIBLIOGRAPHIQUES.....15

X- ADDITIF A LA LISTE DES PUBLICATIONS.....17

A- Titres parus.
B- Titres sous presse.
C- Demandes de tirés à part enregistrées à la suite de quelques publications récentes.
D- Répartition géographique des demandes.

CONCLUSION

Deuxième Partie : BILAN ET PREVISIONS BUDGETAIRES.

I- BILAN 1977.....21

II- PREVISIONS 1978.....22

III- RECAPITULATIF D'ENSEMBLE.....23

I- SPECTRE DE PROTEINES ET PHOSPHATASES ALCALINES DANS L'INTESTIN DE 3 RACES D'ABEILLES.

Les Recherches commencées en 1974 sur ce sujet ont été reprises et approfondies, bénéficiant des divers progrès effectués entre temps sur le double plan théorique et pratique.

a) Spectre protéique.

Il se confirme parfaitement que le spectre protéique de l'intestin se prête mieux à la comparaison des lignées que celui de l'hémolymphe, car il contient de nombreuses fractions de concentrations voisines. Les différences quantitatives entre races entrevues l'année précédente ont été confirmées et précisées; après un certain temps de travail encore nécessaire pour l'achèvement des calculs, cette étude devrait conduire à la rédaction d'un mémoire au cours du 2e semestre 1978.

b) Phosphatases alcalines.

Les 4 fractions d'activité phosphatasique alcaline décrites en 1976 ont été retrouvées, mais dans des proportions relatives parfois différentes pour la même race d'une année à l'autre et différentes, de nouveau, d'une race à l'autre.

Les propriétés cinétiques de l'enzyme ont été vérifiées de manière très approfondie chez les Abeilles noires, et comparées à celles des races italienne et caucasienne. Les résultats, dont le dépouillement demandera encore environ 2 mois de travail compte-tenu des conditions de calcul décrites dans le § II ci dessous, tendent à faire apparaître des différences assez faibles au niveau du paramètre V_M (vitesse maximale) mais plus appréciables dans le cas des paramètres K (constante d'affinité enzyme/substrat) et n (coefficient de HILL : ordre partiel de la réaction relatif au substrat).

L'ensemble des résultats sera examiné au cours de 1978 ou 1979 par comparaison avec les glucosidases et la glycémie (les phosphatases intestinales participent au transport des glucides à travers la paroi intestinale) en relation avec l'aptitude au butinage de ces 3 races placées dans les mêmes conditions de travail (basse Provence).

II- DETERMINATION RIGOUREUSE DES PARAMETRES CINETIQUES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES.

a) Position du problème.

Les travaux réalisés sur les phosphatases alcalines (autrefois chez deux végétaux : l'Orge et l'Arabidopsis, puis chez l'Abeille) ainsi que l'étude détaillée des α -glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles, ont montré de grandes variations de la valeur du coefficient de HILL (ordre partiel de la réaction relatif au substrat

.../...

dans le cas d'une réaction équilibrée du type " Steady State ").

On constate alors une anomalie dans le calcul des paramètres.

L'équation générale s'écrit :

$$v = \frac{V_M . S^n}{K + S^n}$$

dans laquelle : v = vitesse de réaction ; S = concentration en substrat ;
K = constante d'affinité ; n = coefficient de HILL.

Jusqu'à présent, la vitesse maximale et la constante K étaient déduites de la relation : $v^{-1} = f(S^{-1})$, linéaire pour n = 1 (fig.1) et le paramètre (n) était tiré de la forme logarithmique de l'équation de HILL :

$$\text{Log} \frac{v}{V_M - v} = n \log S - \log K$$

Mais si $n \neq 1$, V_M ne peut plus être calculé par une extrapolation linéaire (fig.1), et nous avons montré au moyen d'équations théoriques qu'une erreur sur V_M entraine une erreur importante dans le calcul de n (fig.2).

Une bibliographie portant sur environ 120 références de travaux récents (1975-76-77) montre que ce problème a été jusqu'ici largement négligé et voué à l'empirisme, malgré diverses tentatives de progrès statistiques ou d'édification de modèles analogiques, tous limités aux cas n = 1.

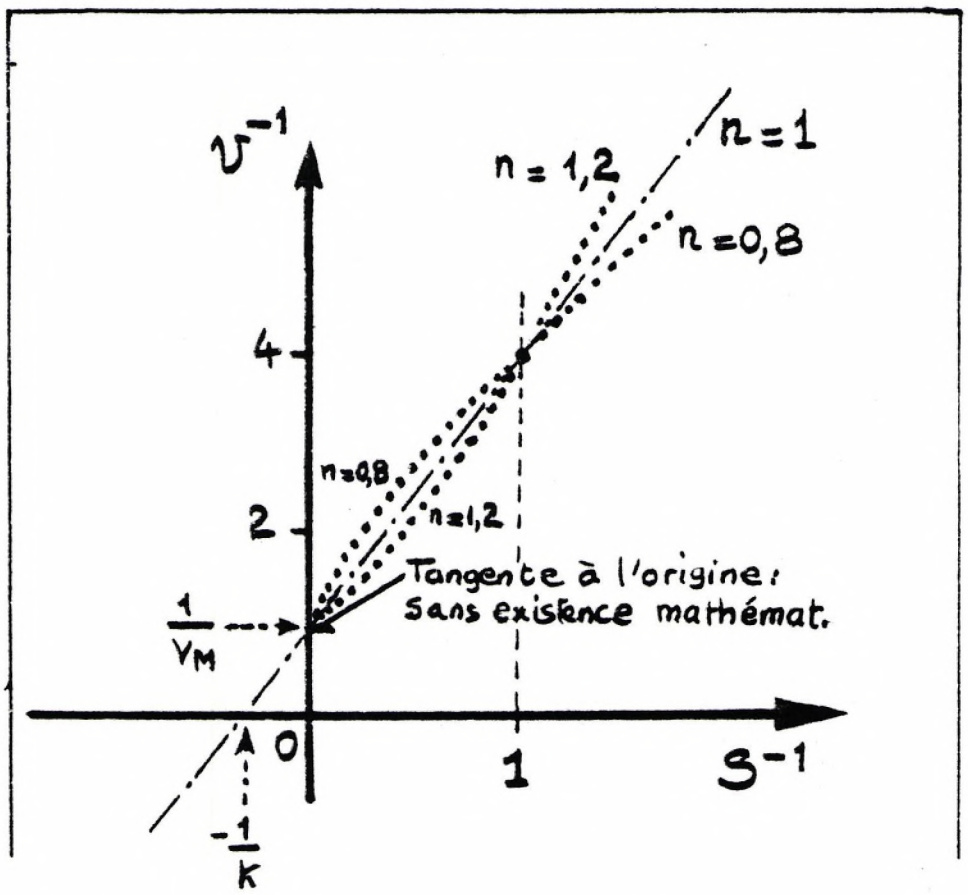


fig.1 - Déviations de la courbe réciproque par rapport à la droite de LINEWEAVER-BURK (—·—·) dans les cas où n ≠ 1.
NB : chaque fois que n ≠ 1, le calcul de la droite de régression de v^{-1} sur S^{-1} conduit à une valeur erronée (ou absurde) de K.
(Cas d'une équation : $v = \frac{1,1 . S^n}{3,5 + S^n}$ observé sur des nymphes d'Abeilles N6).

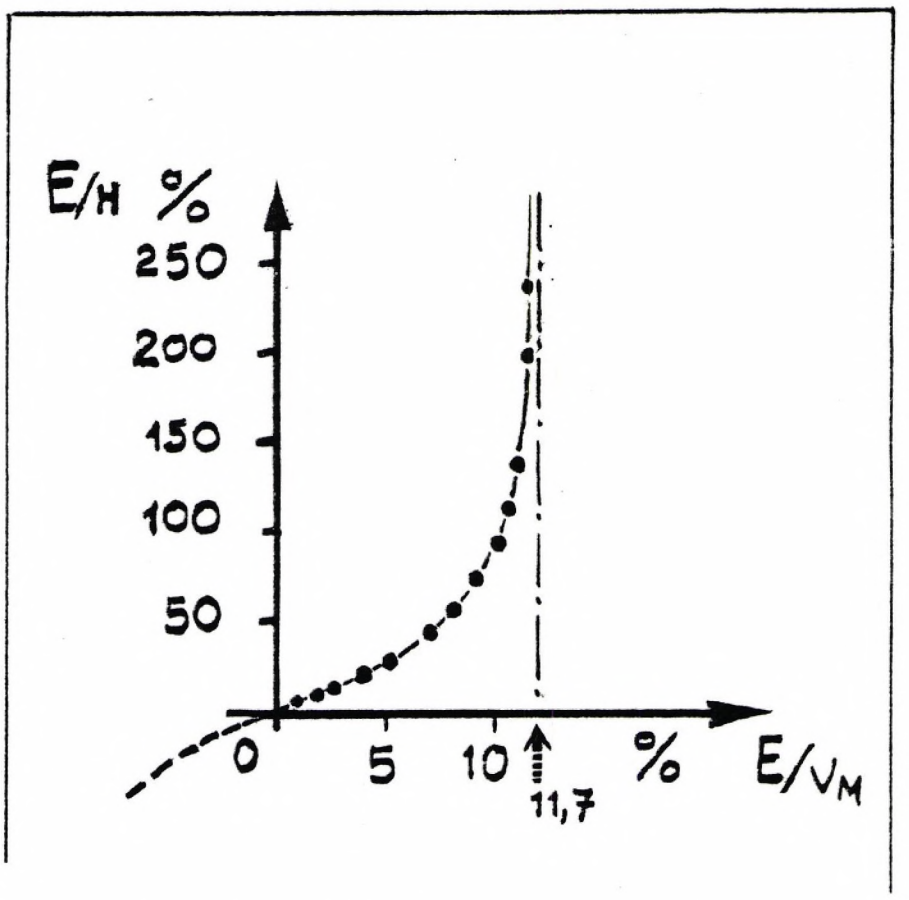


fig.2 - Influence de l'incertitude relative dans la détermination de V_M (notée E/V_M) sur le calcul de l'expression de HILL : $\text{Log} \frac{v}{V_M - v}$ (incertitude notée E/H).

.../...

b) Solution Empirique.

Une amélioration empirique dans le calcul de V_M (non directement mesurable puisqu'il s'agit d'une asymptôte) a été d'abord apportée sur la base suivante : l'extrapolation linéaire de $v^{-1} = f(S^{-1})$ est d'autant moins erronée que les couples de points (S, v) correspondent à des valeurs de v plus proches de la valeur asymptotique V_M :

- en toute rigueur, il s'agirait de déterminer le point d'intersection de la tangente à la courbe $v^{-1} = f(S^{-n})$ avec l'axe des ordonnées lorsque $S \longrightarrow \infty$ soit $S^{-n} \longrightarrow 0$: mais ce point n'a pas d'existence mathématique définie (fig.1), et il a fallu recourir à l'amélioration empirique suivante :
- la valeur asymptotique V_M est d'abord estimée d'après une extrapolation " manuelle " de la courbe réciproque, et le calcul de régression linéaire est ensuite opéré à partir des valeurs expérimentales (v_i) les plus proches de V_M estimé : le calcul effectué à partir d'équations théoriques permet d'assigner au calcul de V_M un degré de précision qui est fonction de l'éloignement maximum de v_i par rapport à V_M réel (fig.3).

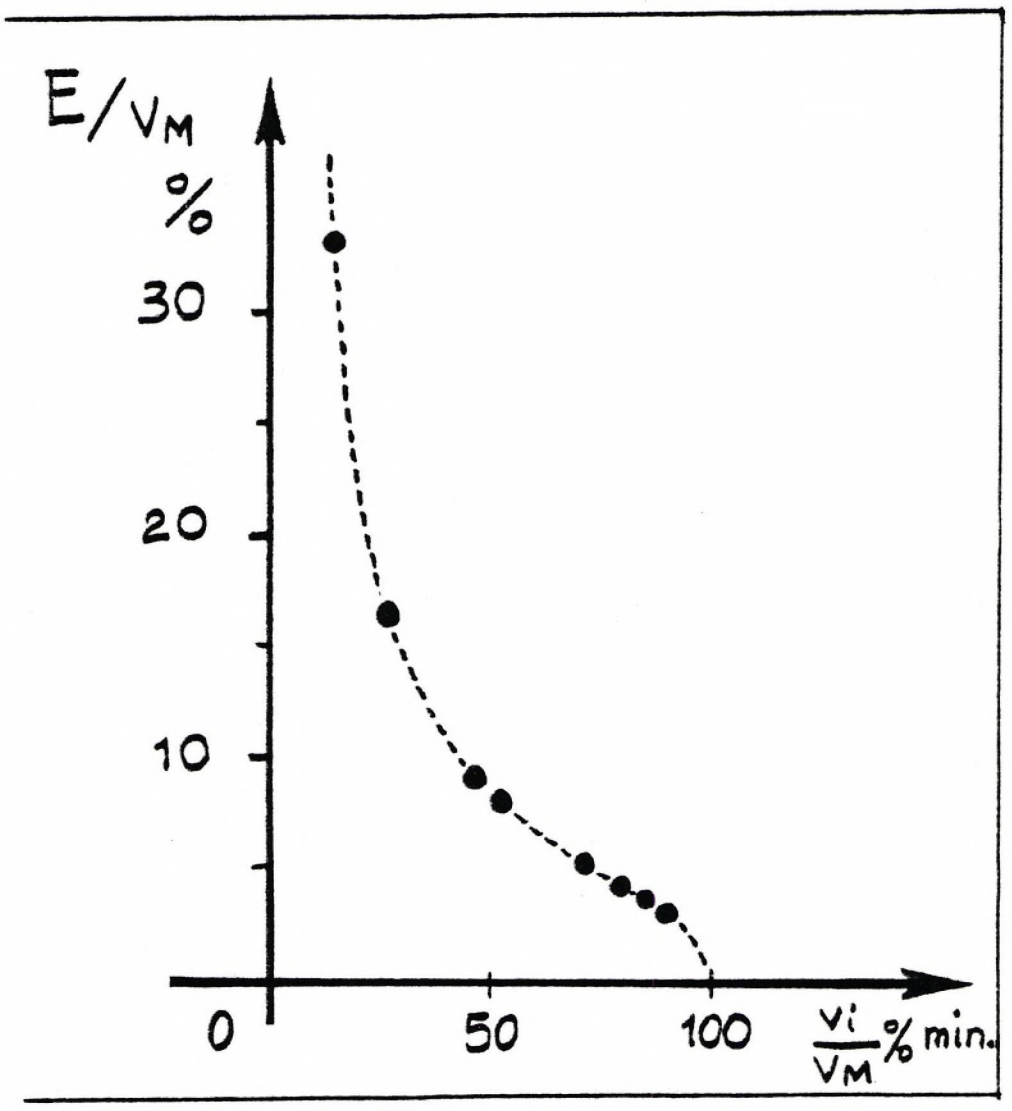


fig.3 - Incertitude relative dans le calcul de V_M (E/V_M) au moyen de la régression linéaire $v_i^{-1} = f(S_i^{-1})$, en fonction de la plus petite valeur du rapport $\frac{v_i}{V_M}$ % prise en compte dans le calcul : exemple dans le cas $v = \frac{V_M \cdot S^{1,2}}{K + S^{1,2}}$.

Ainsi, l'erreur relative est de 5 % si la droite de régression ne comprend que des couples (v_i, S_i) tels que la plus petite valeur de v_i soit égale à 70 % de V_M.

Cette méthode de calcul a apporté un premier progrès très sensible dans la précision de détermination des paramètres cinétiques.

.../...

c) Solution Logique.

Cependant il ne s'agissait encore que d'une approximation.

Un protocole de calcul rigoureux a été établi en collaboration avec M. CALVET, Professeur de MATHEMATIQUES, selon les bases suivantes :

- Les 3 paramètres K, V_M et n ne peuvent découler d'1 seule relation.
- Les valeurs de V et S utilisées pour leur détermination doivent correspondre à un tracé pratique homogène de la courbe de saturation, capable de rendre compte aussi parfaitement que possible de la forme de la courbe, dans la limite de la sensibilité des mesures expérimentales.

Principe : l'équation générale $v = \frac{V_M \cdot S^n}{K + S^n}$ est adaptée à des valeurs remarquables de S : (pour S = i, v mesuré = v_i)

a) S = 1 (1 mM p. ex.) élimine le facteur n et donne :

(S = 1 ⇝ v = v_1)

$$K = \frac{V_M}{v_1} - 1 \quad \text{ou} \quad V_M = v_1(K + 1)$$

b) S = p : conduit à $p^n = \frac{K \cdot vp}{V_M - vp}$

c) S = q : conduit à $q^n = \frac{K \cdot vq}{V_M - vq}$

Le facteur n peut être de nouveau éliminé entre b) et c) sous réserve que :

α- $p \cdot q = 1$ soit : $p^n \cdot q^n = 1$

β- $q = p^t$ soit : $q^n = (p^n)^t$ (t donné).

Le cas α conduit au calcul de V_M (et de K) en tenant compte de a), soit :

$$V_M = \frac{\frac{1}{vq} + \frac{1}{vp} - \frac{2}{v_1}}{\frac{1}{vp \cdot vq} - 1}$$

Le cas β conduit à une équation du 2nd degré, sauf dans le cas particulier où t = 2 qui permet d'éliminer les constantes et amène :

$$V_M = \frac{2\,v_1 + \frac{v_1 \cdot vp}{vq} - vp}{\frac{v_1}{vp} - \frac{vp}{vq}}$$

K est ensuite déduit de 2 manières : d'une part au moyen de la relation $K = \frac{V_M}{v_1} - 1$ et d'autre part d'après la forme logarithmique de l'équation de HILL dont

.../...

la linéarité n'est pas mise en cause dans la limite des proportions observées dans la pratique expérimentale entre les valeurs de v_i et celle de V_M (fig.4).

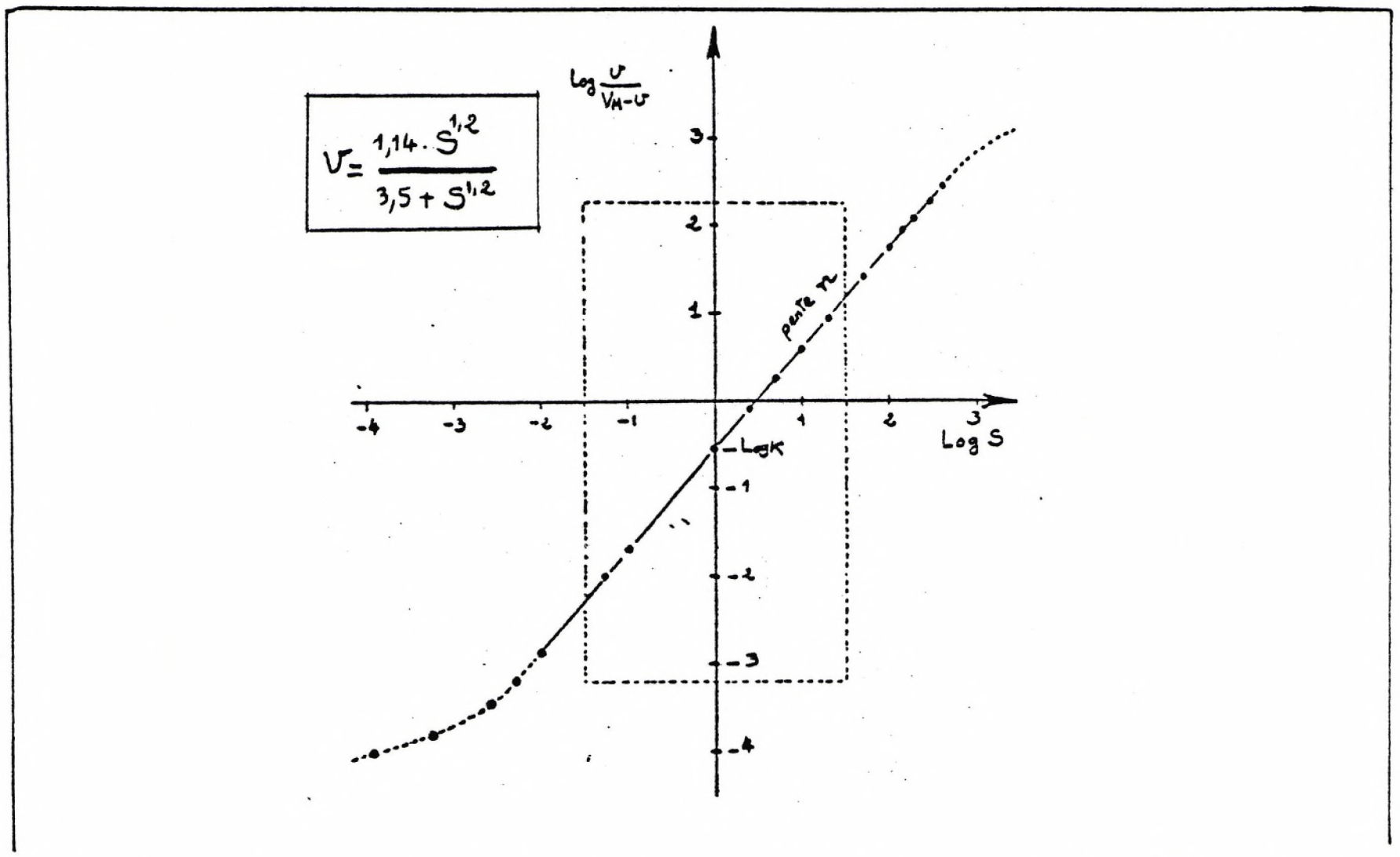


fig.4 - Limites de linéarité de la courbe de HILL. La zone utile (⬚) s'étend en pratique de S = -1,5 à S = +1,5.

L'incidence des erreurs sur l'un des paramètres sur la détermination des 2 autres est en cours d'étude.

Toutes les cinétiques mesurées de 1974 à 1977 sont en cours de révision compte tenu de ces données théoriques, ce qui représente, pour 1978, un travail extrêmement lourd mais fructueux.

Un mémoire détaillé consacré à ce problème sous ses divers aspects est en préparation : il serait souhaitable de pouvoir le soumettre le plus tôt possible pour publication (1er semestre 1978) compte tenu du contexte bibliographique international actuel.

III- INHIBITION DE TYPE " n " DES α-GLUCOSIDASES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLES PAR LE GLUCOSE.

Le travail effectué depuis 2 ans à ce sujet chez les pré-nymphes a vu le jour en partie sous forme d'une communication à l'Académie des Sciences.

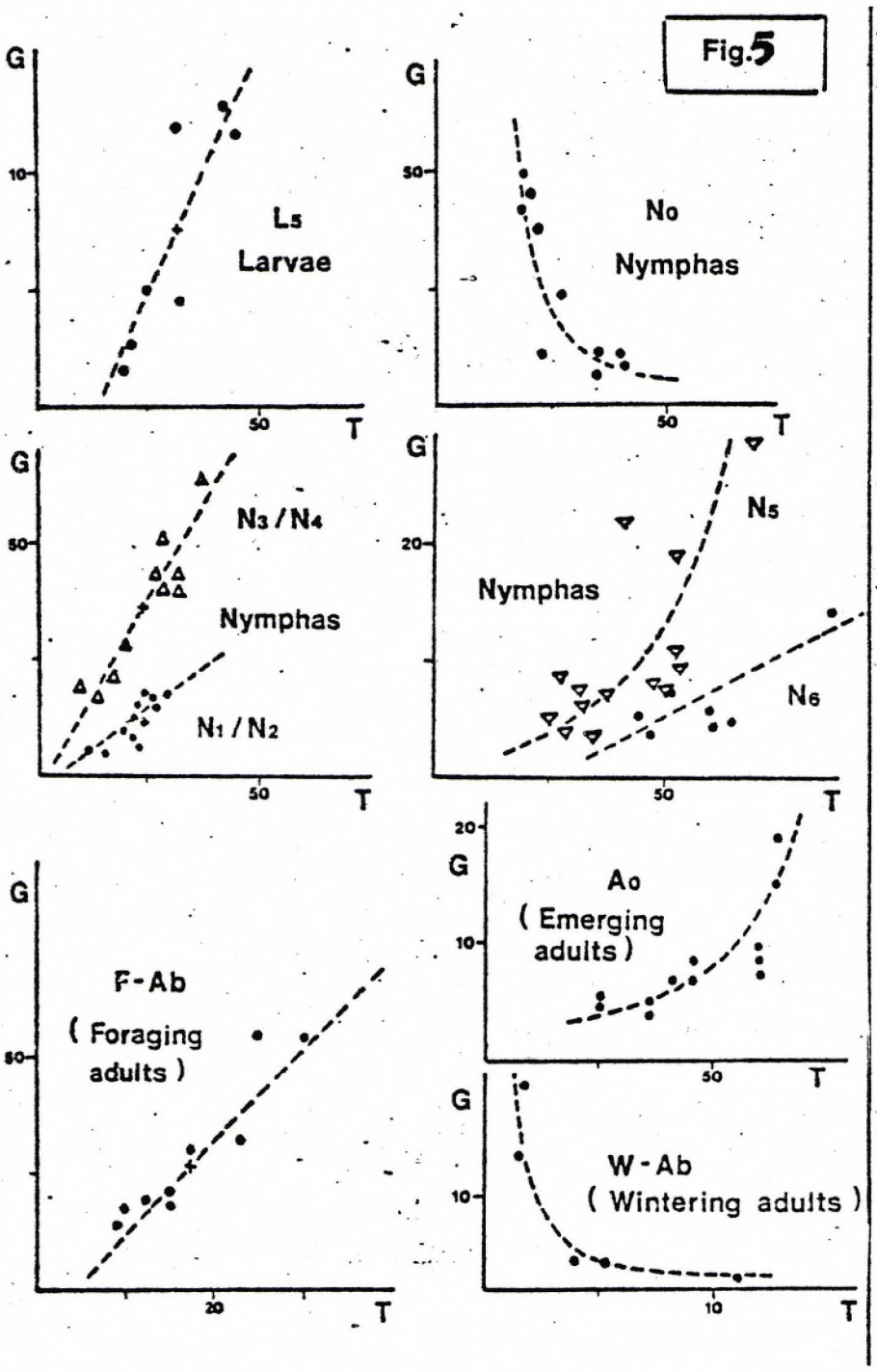
La relation n = f(I) fait l'objet d'une étude théorique qui devrait aboutir à une équation constituée de paramètres connus.

.../...

La clé du résultat dépend de la nature de la valeur limite que prend n lorsque I tend vers l'infini (c'est, en principe l'affinité enzyme/inhibiteur, n_i, mais avec quelques réserves, en cours d'étude).

IV- RELATIONS INTRA-GLYCEMIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'ABEILLE NOIRE.

Les résultats numériques de 4 ans d'étude de la glycémie chez l'Abeille noire ont été confrontés : il apparaît que la variabilité des teneurs en Tréhalose, Glucose et Fructose n'est pas le fruit du hasard : à certains stades, ces facteurs sont liés deux à deux par une forte corrélation positive, tandis qu'à d'autres (pré-nymphes : voir chap.III) ils sont en forte corrélation négative : ceci donne à penser que dans le premier cas ils proviennent d'un précurseur commun tandis que dans le second, ils sont synthétisés l'un aux dépends de l'autre (fig.5-6).



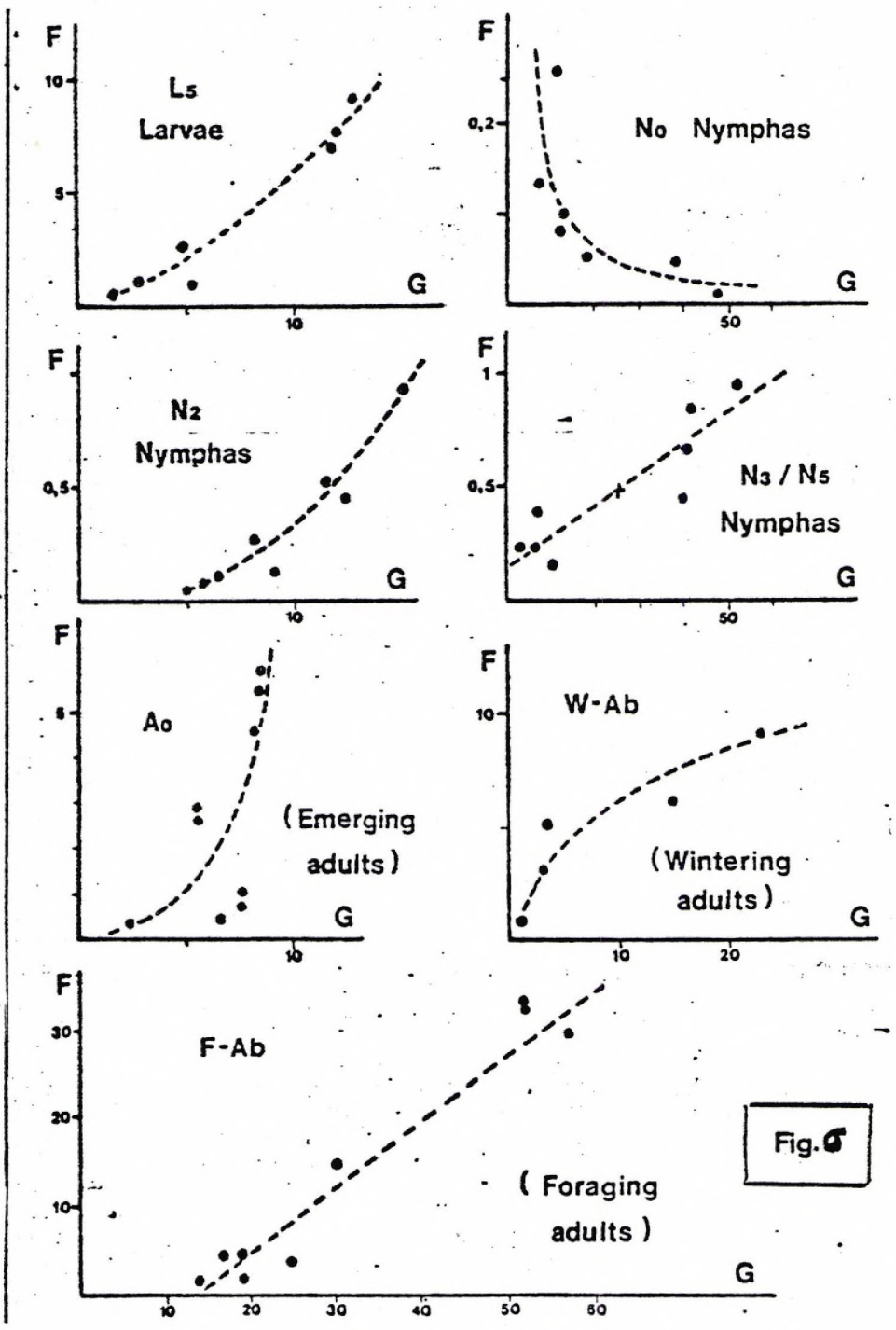


fig.5 - Relations entre la Glucosémie et la Tréhalosémie (exprimées en mM) au cours du développement de l'Abeille. Droites de régression ou courbes probables.

fig.6 - Relations entre la Fructosémie et la Glucosémie (exprimées en mM) au cours du développement de l'Abeille.

Race : *Apis mellifica, mellifica* L. (écotype Provence).

.../...

(Manuscrit missous presse le 1/2/78 : *Comp. Biochem.* and *Physiol.*)

Les notions ainsi acquises seront incluses dans la recherche des corrélations éventuelles entre le métabolisme énergétique et les capacités de butinage de diverses lignées d'Abeilles, ainsi que dans l'interprétation de l'influence des hormones hyper et hypo-glycémiantes.

V- EFFETS COMPARES DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE DEHYDRO-ASCORBIQUE SUR L'AMINO-ACIDEMIE DE *LASPEREYSIA POMONELLA*.

Les expériences réalisées en 1975, dans le cadre d'un ensemble de travaux sur le rôle de l'acide ascorbique (ASC) dans la nutrition de Lépidoptères phytophages, n'avaient été terminées qu'en ce qui concerne les glucides : les chromatographies d'acides aminés n'ont été exploitées qu'en 1976-77 car des progrès analytiques ont été réalisés entre temps. Actuellement, le dépouillement numérique vient d'être effectué et le dernier manuscrit de la série sera proposé au cours de 1978. Ce programme est maintenant abandonné, les données acquises ayant répondu à la demande des nutritionnistes.

VI- ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA COCCINELLE APHIDIPHAGE *SEMIADALIA UNDECEMNOTATA*.

Monsieur FERRAN, chercheur à la Station de Zoologie INRA d'Antibes a été reçu au mois de juin au Laboratoire, dans le cadre d'un stage de formation pour l'analyse par micro chromatographie quantitative en couche mince. La liste complète du matériel d'équipement et des produits chimiques nécessaires avait été préalablement communiquée à l'intéressé.

Au cours de cette période d'initiation, des analyses préliminaires de glucides, lipides et amino-acides ont été réalisées sur la coccinelle, aux stades de Larves et d'Adultes. Ces travaux seront ensuite poursuivis à Antibes sous le parrainage du Laboratoire de Biochimie.

VII- DIVERS (Services rendus).

L'analyse des glucides d'échantillons de miels et miellats provenant des environs de la Centrale Nucléaire EDF de Fessenheim a été effectuée comme chaque année au moyen des techniques mises au point au laboratoire.

.../...

Divers échantillons de " Sucres de Stockage " d'Abeilles ayant été nourries au moyen de " sirops " récemment commercialisés sous Brevet INRA ont été également analysés au cours de l'année.

Dans chaque cas, j'ai procédé personnellement aux enregistrements photométriques des chromatogrammes.

VIII- DISCUSSION ET PROJETS

Les travaux du Laboratoire de Biochimie s'insèrent dans les préoccupations du Département de Zoologie par plusieurs voies convergentes. L'orientation enzymologique des Recherches a été guidée, en effet, par le souci de rattacher les programmes du laboratoire, à court terme, à certains objectifs immédiats, mais également de leur ouvrir la perspective de répercussions à long terme sur divers problèmes agronomiques importants.

1º Les Glucosidases.

a) La comparaison de génotypes, et la génétique des populations font maintenant très largement appel à des critères biochimiques pour caractériser les polymorphismes. Lorsqu'il s'agit de formes moléculaires d'enzymes, il est déjà nécessaire de connaître les divers paramètres permettant de mettre en relief, de façon reproductible, le maximum d'activité. Celà suppose donc une démarche préliminaire parfois importante sur le plan enzymologique fondamental.

b) D'autre part, les critères polymorphiques retenus pour comparer des lignées, sont souvent choisis en fonction de certaines commodités expérimentales, relevant quelquefois d'une pure tradition. Il est bien connu que leur valeur significative est alors temporaire, puisque le déterminisme génétique correspondant risque de n'être lié au caractère étudié (Objectif de Sélection, p. ex.) que par coïncidence. C'est pourquoi le Laboratoire de Biochimie s'est orienté vers la recherche et l'étude de critères pouvant présenter un véritable lien de causalité avec les objectifs, et offrir, de ce fait, davantage de garanties (en particulier dans le temps) quant à la représentativité des caractères concernés.

Ainsi, chez l'Abeille, une pression de Sélection visant à améliorer la productivité des colonies, atteindra très probablement la capacité de butinage des individus, donc le " dynamisme " de leur métabolisme énergétique : une enzyme qui libère le glucose (" combustible " de base) dans l'hémolymphe, risque donc d'être impliquée de manière étroite dans un tel système et certaines de ses propriétés (cinétiques, induction, structure, régulation) ont une forte probabilité d'être significativement liées à l'objectif.

.../...

c) La caractérisation de certaines propriétés relatives au métabolisme énergétique des Insectes peut déboucher, à terme, sur une appréciation du " Potentiel Biotique " des individus ; or cette notion est fondamentale chaque fois que des Insectes sont élevés artificiellement avant d'être confrontés directement ou indirectement avec leurs homologues de la Nature : la compétition est directe lorsqu'il s'agit, par exemple de lâchers de mâles stériles, de piégeages sexuels, voire de parasites ou de prédateurs à action immédiate ; elle est indirecte, mais tangible, lorsque ces Insectes doivent servir d'hôtes aux précédents, ou sont destinés à éprouver des méthodes de lutte.

d) Il n'est pas inutile de rappeler que de simples facteurs nutritifs peuvent induire des modifications parfois durables de certaines propriétés enzymatiques, et que ces modifications interfèrent, en retour, à la fois avec la manifestation des caractères polymorphiques et avec les potentiels biotiques. Celà vient ajouter un intérêt supplémentaire à celui que présentent les glucosidases des glandes salivaires et de l'intestin dans le domaine de la Nutrition.

e) Il est certain que l'analyse quantitative descriptive (glycémie p. ex.) ne suffira pas forcément, à elle seule, à mettre en lumière les différences recherchées : mais celles ci, que nous pourrions qualifier de " cryptiques ", apparaîtront plus sûrement au terme d'épreuves dynamiques telles que l'hyper ou l'hypo-glycémie provoquées.

C'est pourquoi les recherches actuelles sur l'inter-dépendance Glycémie/Glucosidases doivent trouver leur suite logique dans la recherche (annoncée depuis 1975) de facteurs hyper et hypo-glycémiques.

L'extraction et la purification d'hormones des corpora cardiaca d'orthoptères est en cours chez divers laboratoires étrangers (TAGER et al., 1976, *Bioch J.*, 156, 515-520 ; KRAMER, 1977, *J. Insect Physiol.*, 23, 293-295), mais les expériences sur l'action de ces facteurs sur la glycémie des Insectes donne encore lieu à des résultats contradictoires (HANAOKA, 1976, *Insect Biochem.*, 6, 621-625 ; HOLWERDA, 1977, *Insect Biochem.*, 7, 151-157). Ces recherches, déjà abordées en réalité depuis assez longtemps (STEELE, 1961, *Nature*, 192, 680-681 ; BOWERS etc., 1963, *Nature*, 198, 685 ; RALPH, 1962, *Am. Zool.*, 2, 550) se sont heurtées à de réelles difficultés expérimentales inhérentes à la taille des sujets et aux propriétés de l'hémolymphe (ISHAY et al., 1976, *Ins. Soc.*, 23, 23-28) ; d'autre part, l'isolement et l'étude des conditions d'intervention de ces hormones pose encore de nombreux problèmes (MORDUE et al., 1977, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 33, 103-108). Le laboratoire de Biochimie n'est actuellement pas en mesure d'aborder l'étude des hormones de l'Insecte, mais tous les paramètres expérimentaux sont maintenant établis en vue de réaliser une étude décisive de l'influence des hormones connues chez les vertébrés sur les variations relatives de la Glucosémie et de la Tréhalosémie ; les résultats d'étude des relations intra-glycémi-

.../...

ques naturelles (§ IV, p. **7**..) permettront, en outre d'interpréter les résultats de manière très significative.

f) D'autres centres d'intérêt viennent, enfin, étayer le choix des glucosidases (même s'ils ne devaient jamais conduire à la préparation d'un programme). Il est connu, par exemple, que les Insectes peuvent " détoxifier " leur organisme en neutralisant les radicaux chimiques exogènes dangereux (pesticides p. ex.) sous forme de glucosides (MYERS & SMITH, 1954, *Biochem. J.*, 56, 498). D'autre part, il est à prévoir, compte tenu de l'importance que devraient occuper les Noctuidés dans les futurs programmes du laboratoire, que des questions de déterminisme biochimique de diapause, comparativement chez diverses lignées, viendront se poser. Le métabolisme glucidique intervient de manière très concrète au niveau de ce phénomène (CHINO, 1958, *J. Insect Physiol.*, 2, 1) (KAGEYAMA et al., 1975, *Tampa Kushitsu Kakusan Koso*, 20, 1285-1300), de sorte qu'il sera utile, en temps voulu, de disposer de jalons d'étude dans ce domaine.

2º Le Métabolisme lipidique (Projets).

Le programme de Recherches sur les lipides, qui pourrait constituer l'un des principaux objectifs à long terme du Laboratoire, a été envisagé dès 1975 et proposé de manière plus concrète sous forme de D.O.R. en 1977.

Ce choix trouve son origine dans l'important problème agronomique posé par le comportement migrateur des Noctuidés, dont l'extraordinaire puissance de vol paraît liée à un métabolisme énergétique de type lipidique. D'autres arguments, d'ordre bibliographique, montrent, en outre, qu'il existe entre les activités métaboliques lipidique et glucidique liées au vol, un équilibre et une inter-dépendance qu'il n'est pas possible de négliger, compte tenu des objectifs de l'INRA *in fine*.

a) Inter-dépendances métaboliques glucido-lipidiques.

S'il paraît acquis, chez les mammifères, que le glucose stimule le métabolisme lipidique, en particulier la synthèse des tri-glycérides (RAO et al., 1975, *Lipids*, 10, 409-412), de récents travaux montrent que le problème s'avère très complexe chez les Insectes, dont le métabolisme énergétique peut passer d'une dominante glucidique à une dominante lipidique (ou réciproquement) sous l'action de simples facteurs nutritifs ou en fonction de leur activité. Ainsi, chez les orthoptères, le Tréhalose puis les di-glycérides, respectivement, sont-ils impliqués successivement à partir du début du vol, comme sources d'Energie (JUTSUM & GOLDSWORTHY, 1976, *J. Ins. Physiol.*, 22, 243-249). Selon d'autres auteurs, de fortes glycémies diminuent la mobilisation des lipides pour le vol, et l'injection de tréhalose, tout en réduisant le taux d'hormone lipido-stimulante, permet le maintien d'une certaine vitesse de vol. Par contre, le saccharose, qui produit le même effet sur les lipides, n'est pas utilisé pour le vol (CHEESEMAN et al., 1976, *Physiol. Entomol.*, 1, 115-121). Des extraits de corpora

.../...

cardiaca injectés à des orthoptères conduiraient par contre (selon HOLWERDA et al., 1977, *Insect Biochem.*, 7, 151-157) à une hyper-glycémie et une stimulation lipidique. Enfin, l'utilisation du tréhalose serait inhibée compétitivement par certaines lipo-protéines de l'hémolymphe (ROBINSON & GOLDSWORTHY, 1977, *J. Insect Physiol.*, 22, 1559-1564). Les mêmes auteurs ont montré qu'en présence de tréhalose, l'utilisation des lipides à partir de préparations de lipo-protéines est favorisée si l'extrait contient de l'hormone lipido-stimulante des corpora cardiaca, et que l'utilisation du glycérol n'est pas inhibée. Les auteurs pensent toutefois que la glycolyse est ralentie lorsque l'oxydation des lipides est favorisée.

Les Inter-relations glucido-lipidiques se manifestent également au cours de la Diapause qui donne lieu à une accumulation de glycérol aux dépends du glycogène (WYATT et al., 1959, *J. Gen. Physiol.*, 42, 1005 ; SALT, 1959, *Can. J. Zool.*, 37, 59 ; DUBACH et al., 1959, *Nature*, 184, 288).

b) Le Métabolisme énergétique lipidique et son contrôle.

La biosynthèse des lipides d'Insectes paraît s'effectuer selon les voies déjà connues chez d'autres organismes. Les premiers travaux ont montré que le contrôle de la synthèse des acides gras s'effectue en partie par rétro-inhibition (HORIE et al., 1971, *J. Ins. Physiol.*, 17, 1441-1450), mais également par un système régulateur auquel participent le NADPH et l'ATP (MUNICIO et al., 1970, *Comp. Biochem. Physiol.*, 37, 387-395 et 1972, *Insect Biochem.*, 2, 353-360). La possibilité d'un contrôle hormonal a été mise en évidence voici 10 ans (MAYER & CANDY, 1967, *Nature*, 215, 987 et 1969, *J. Insect Physiol.*, 15, 611-620) : des extraits de corpora cardiaca d'orthoptères injectés aux Insectes augmentent la lipémie (diglycérides) ; le facteur actif a été identifié très tôt à un peptide présent dans l'hémolymphe de sauterelles ayant volé (BEENAKKERS, 1969, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 13, 492) et absent chez les Insectes n'ayant pas volé (GOLDSWORTHY et al., 1972, *J. Comp. Physiol.*, 79, 85-96 et *Gen.Comp. Endocrinol.*, 18, 545-551). Le contrôle de la lipolyse du corps adipeux de la Blatte serait soumis à un système faisant intervenir l'AMP-3'-5' cyclique (BHAKTMAN & GILBERT, 1968, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11, 186-197). Par contre l'injection d'hormone lipido-stimulante présente dans les corpora cardiaca de la Blatte diminuerait la lipémie au profit du corps adipeux (DOWNER & STEELE, 1069, *Proc. Entomol. Soc. Ont.*, 100, 113-116).

L'étude du facteur lipido-stimulant a été reprise tout récemment : il s'agit d'un peptide constitué de 9 unités (7 amino-acides différents) (STONE et al., 1976, *Nature*, 263, 207-211). Son effet sur la lipémie continue à être étudié chez les orthoptères (MWANGI & GOLDSWORTHY, 1977, *Physiol. Entomol.*, 2, 37-42) et son mécanisme d'action paraît se répercuter au niveau de nucléotides cycliques (GADE & BEENAKKERS, 1977, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 32, 481-487). Ces travaux, quoique très limités en nombre, s'étendent au niveau de la localisation cellulaire et intra-cellulaire du phénomène (ROBINSON & GOLDSWORTHY, 1977, *J. Insect Physiol.*, 23, 153-158).

.../...

Ces travaux, pour importants qu'ils soient, restent limités à la Section des Polynéoptères, et les résultats concrets sont encore très loin d'être convergents.

Chez les Noctuidés proprement dits, une étude montre que le renouvellement métabolique des diglycérides est de 1 H au cours du vol et de 6 H au repos, ce qui confirme l'importance énergétique des lipides (VAN HANDEL & NAYAR, 1972, *Insect Biochem.*, 2, 8-12 et 203-208).

c) Lipides et diapause.

Un travail éventuel sur le déterminisme de la diapause chez diverses espèces ou races de lépidoptères phytophage ne saurait ignorer l'importance des lipides, déjà mise en évidence depuis fort longtemps (SQUIRE, 1940, *Bull. Entomol. Res.*, 31, 1-6 ; RUSTOM, 1960, *Bull. Soc. Entomol. Egypt.*, 44, 421-449 ; IKAN et al., 1970, *Comp. Biochem. Physiol.*, 37, 205-214).

De plus, il apparaît, que la composition lipidique, et le comportement de diapause, peuvent être liés à différents facteurs d'élevage, soit physiques (WATSON et al., 1973, *Environ. Entomol.*, 2, 967-970) soit nutritifs (ADKISSON, 1961, *J. Econ. Entomol.*, 54, 1107-1112 ; SCHAEFER, 1968, *J. Insect Physiol.*, 14, 171-178) et des travaux récents montrent que les inter-relations entre ces facteurs sont encore mal connues (FOSTER & CROWDER, 1976, *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B, 519-521).

d) Transport des lipides.

Il est pratiquement admis, maintenant, que chez les Insectes dont le métabolisme est à dominante lipidique, la forme de stockage dans le corps adipeux est constituée de triglycérides ; le transport par l'hémolymphe s'effectue sous forme de diglycérides selon les uns (BEENAKKERS & GILBERT, 1968, *J. Insect Physiol.*, 14, 481-494) mais aussi d'acides gras, selon les autres (WLODAWER et al., 1966, *J. Insect Physiol.*, 12, 547-560 ; et 1967, *J. Insect Physiol.*, 13, 319-331) ; les acides gras libres sont ensuite restitués aux muscles de vol à titre de " combustibles directs ". Enfin, selon de récents travaux il existerait dans l'hémolymphe des fractions protéïques de haut poids moléculaire spécialisées dans le transport des di-glycérides, et soumises à l'action des hormones des corpora cardiaca (MWANGI & GOLDSWORTHY, 1977, *Physiol. Entomol.*, 2, 37-42).

e) Projets expérimentaux.

Tels sont quelques uns des principaux arguments qui ont présidé au choix des orientations futures du Laboratoire de Biochimie dans le domaine des lipides, conjointement à la poursuite des Recherches déjà bien avancées dans le domaine de la glycémie.

Il paraîtrait indiqué de comparer la distribution tissulaire quantitative des diverses classes de lipides en fonction des caractères écophysiologiques (objets des préoccupations de l'INRA) afin d'orienter et localiser les Recherches sur un système lipasique d'action déterminante à l'égard des phénomènes considérés : la démarche

.../...

suivrait alors une voie parallèle à celle suivie au cours des travaux sur l'α-glucosidase, avec la recherche de facteurs de contrôle de type nutritif d'abord, et éventuellement hormonaux ensuite. La comparaison de l'importance respective des facteurs glucidiques et lipidiques, et l'étude de leur équilibre relatif pourrait être réalisée dans chaque cas important et apporter des informations extrêmement précieuses.

3º Les Phosphatases alcalines.

Les Recherches sur les Phosphatases alcalines de l'Abeille, entreprises en 1974 et poursuivies dans la limite des possibilités matérielles, se justifient également par le large spectre d'intérêts que présente cette classe d'enzymes à l'égard des principales préoccupations du Laboratoire de Biochimie, à court et à long terme.

a) Les Phosphatases alcalines sont très largement utilisées dans le monde vivant, animal et végétal, comme marqueurs génétiques : mais elles n'ont pratiquement pas encore été exploitées chez les Insectes d'importance agronomique dont se préoccupe le Département de Zoologie. Leur utilisation à cette fin suppose l'acquisition de connaissances supplémentaires sur leurs propriétés et leur fonctionnement, ce qui se justifie d'autant plus que de nombreux liens sont tissés entre les métabolismes lipidique et glucidique par cette classe d'enzymes.

b) Ainsi, au delà de leur rôle, déjà admis, dans la digestion et le transport des métabolites chez les Insectes (CHEN, 1971, *Biochem. Asp. Insect Devel.*, 23-24 ; TURBECK, 1968, *B.B.A.*, 163, 354-361), les Phosphatases sont connues pour leur intervention dans la biosynthèse du tréhalose (FRIEDMANN, 1967, *Arch. Biochem. Physiol.*, 4, 69-211), l'absorption intestinale des lipides (TSELUIKO, 1973, *Gistokhim. Fosfomonoesteraz Norme Patol.*, 17-22) ainsi que leur sensibilité à l'action de certains glycérides (MITYUSHOVA et al., 1976, *Dankl. Akad. Nauk.*, 230, 992-994) et leur rôle dans l'hydrolyse de phospholipides (SNYDER et al., 1970, *Biochemistry*, 9, 5034-5036).

c) Leurs variations d'activité (déjà observées en 1974 chez nos Abeilles) sont caractéristiques de certaines phases du développement des Insectes (NATH et al., 1973, *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 66, 280-284 ; JOSHI, 1976, *Curr. Sci.*, 45, 101 ; MININA et al., 1974, *Biokhim. Nasekomykh.*, 16, 9-90) et peuvent servir d'indice de ponte, voire même d'une mortalité imminente ! (SHAND et al., 1975, *Can. J. Zool.*, 53, 1500-1504). Enfin selon KUCERA, 1976 (*Acta Entomol. Bohemoslov.*, 73, 367-372) les modifications de l'activité phosphatasique pourraient constituer, chez l'Abeille, un indice d'infection par la " Nosémose ".

d) Sur le plan structural, KUBICZ & GALUSZKA, 1971 (*Zool. Pol.*, 21, 51-58) ont montré que les formes moléculaires séparées par électrophorèse sont caractéristiques des castes chez l'Abeille, mais les premières véritables recherches sur leurs

.../...

propriétés n'ont été entreprises que récemment, chez les lépidoptères (MOLDENKE, 1976, *Insect Biochem.*, 6, 187-191). Cependant, l'examen attentif des publications laisse apparaître des imprécisions, en particulier pour ce qui concerne la forme des cinétiques de réactions.

Ces quelques éléments bibliographiques donnent un aperçu de l'intérêt que présente l'étude des Phosphatases alcalines dans les tissus d'Insectes.

Les premières études effectuées au Laboratoire depuis quelques années dans ce domaine, sont tout à fait justifiées, mais leur maintien parmi les objectifs à moyen terme dépendra de facteurs extra-Scientifiques.

IX- ACTIVITES BIBLIOGRAPHIQUES

La Recherche Bibliographique occupe qualitativement et quantitativement une place de plus en plus importante parmi les activités du Laboratoire.

La Biochimie est, en effet, une Science dont l'évolution extrêmement rapide apporte chaque mois une masse de données nouvelles qui viennent compléter, corriger et parfois annuler les connaissances antérieures, même récentes. La sélection de références utiles ne peut d'autre part se limiter aux seuls travaux effectués sur les Insectes, car les grands progrès dans la compréhension des mécanismes biochimiques fondamentaux proviennent le plus souvent de travaux réalisés chez les vertébrés et les micro-organismes et peuvent alors servir de fil conducteur aux recherches conduites chez les Insectes.

Il est donc nécessaire de passer en revue un grand nombre de références dont la sélection des plus importantes ou des plus utiles ne peut être effectuée sur la seule indication du titre ou des mots-clés, mais au minimum après lecture d'un résumé (opération pour laquelle aucun système automatique ne peut encore remplacer le travail cérébral de l'intéressé...).

Voici le processus actuellement suivi dans la pratique :

a) Dépouillement très détaillé de la " Biochemistry Section " des " Chemical Abstract " dont les numéros nous sont très obligeamment communiqués, au fur et à mesure de leur parution, par la Station voisine de Technologie des Produits Végétaux (recherche en index-matières de 115 descripteurs fondamentaux et examen systématique des grandes rubriques telles que : " non-mammalian biochemistry " ou " enzymology ").

L'examen de numéros récents des revues " Insect Biochemistry " et " Journal of Insect Physiology ", amicalement envoyés par le Laboratoire de Biologie Animale de l'INSA de LYON permet en outre, par intervalles, d'obtenir plus rapidement le texte complet de certains articles.

.../...

b) Second Tri des références d'après les résumés, et envoi des demandes de tirés à part aux auteurs, puis commande CNRA/CNRS en cas de non-réponse dans les 2 à 3 mois (tenue d'une " comptabilité ").

c) Indexation et classement des fiches (par matières et auteurs) selon le code bibliographique spécialement adapté aux besoins du Laboratoire d'après les principes antérieurement appliqués à la Biochimie végétale ; puis classement des textes complets (par auteurs, avec renvoi au classement matières) de sorte que les deux entrées comportent leurs renvois réciproques.

A titre d'exemple, voici les résultats numériques de la prospection réalisée au cours des 5 derniers mois :

Secteur de Recherche	Nombre de références classées sur fiches	
	Total	dont " Insectes "
Glucides/Glycémie	317	142
Glucosidases	107	42
Phosphatases alcalines	106	28
Cinétique Enzymatique	149	0
Lipides/Lipémie/Lipases	191	140
Pucerons	44	44
Total	914	396

Ce travail ne constitue qu'une étape de la bibliographie. A partir de là seront extraites (par sélection au 3e degré) les références retenues pour la rédaction des mises au point bibliographiques prévues et celles choisies pour être citées dans les publications ; les plus déterminantes, capables d'influer sur l'orientation ou la conduite des programmes sont incluses dans les dossiers de travail correspondants, sous forme de synthèses à usage interne.

.../...

X- ADDITIF A LA LISTE DES PUBLICATIONS

- BIBLIOGRAPHIE 1977 -

A- TITRES PARUS.

BOUNIAS, M. 1977 - Détermination des paramètres d'inhibition enzymatique dans le cas d'un mécanisme de type K : application au contrôle de l'activité ∝-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles par le glucose. *C.R. Acad. Sc.* (D), 285, 261-264.

BOUNIAS, M. 1977 - Kinetics properties of Alk. Phosphatases (E.C. -3-1-3-1) of Honeybee gut. Influence of some natural amino-acids. XXVIe *Int. Congr. Apic. Res.* (Apimondia), Adelaïde (AUSTRALIA) oct. 1977, 9pp.

BOUNIAS, M. et BONNOT, G. 1977 - L'acide ascorbique dans la nutrition artificielle de *Chilo suppressalis* WLK. (Lepid. Pyralidae). *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 9(4), 1.

BOUNIAS, M. 1977 - Modifications des propriétés cinétiques des ∝-glucosidases de l'hémolymphe, accompagnant les variations de la glycémie induites par le nourrissement artificiel de l'Abeille naissante. *IVe Coll. Physiol. Ins.*, Talence, 6-7 mai 1977 " Métabolisme de l'Insecte ". 2pp.

BOUNIAS, M. 1977 - Inhibition mixte de type " n " de l'activité ∝-glucosidasique de l'hémolymphe par le glucose chez les prénymphes d'Abeilles. *C.R. Acad. Sc.* (D), 285, 1263-1266.

B- TITRES SOUS PRESSE.

BOUNIAS, M. 1978 - Paramètres cinétiques d'oxydation de l'acide ascorbique par l'eau oxygénée *in vitro*. Application à la préparation de l'acide déhydro-ascorbique pour l'étude de la nutrition artificielle de Lépidoptères phytophages. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 10.

BOUNIAS, M. 1978 - Intra-glycemic relations occurring during the development of Honeybees workers (*Apis mellifica, mellifica* L). *Comp. Biochem. Physiol.* Reçu pour publ. le 22/12/77. Accepté et mis sous presse le 1/2/78.

C- DEMANDES DE TIRES A PART ENREGISTREES A LA SUITE DE QUELQUES PUBLICATIONS RECENTES.

- Protéines d'Abeilles (*Apidologie* 1975-76) I : 97, II : 98, III : 44.
- Ac. Ascorbique (*Ann. Zool.* 1976) : 18.
- ∝-Glucosidases (*Apidologie* 1976) : 13.
- " (*C.R. Acad. Sc.* 1977, 285, p.53-56) : 29.
- " (" " " 261-264) : 27.
- " (" " " 1263-1266) : 14.
- Glucides : analyse C.C.M. (*Analusis* 1976) : 21.

.../...

D- REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES DEMANDES.

Sur 212 demandes récentes :

U.S.A. : 56
France : 52
Allem./Autriche : 17
Europe Centr./Est : 17
Amérique Latine : 14
Inde : 12
Canada : 11
Grande Bretagne : 9
Belg./Pays Nordiques : 9
Japon : 6
Afrique : 4
Israël : 2
Guadeloupe : 2
Australie : 1

CONCLUSION

" Point ne serait nécessaire d'entreprendre de Recherche si les résultats étaient connus d'avance ". Cette affirmation, qui tient d'une lapalissade, n'est peut-être pas aussi évidente et certaines objections pourront être formulées à l'encontre des programmes proposés par le Laboratoire de Biochimie sous prétexte " de vouloir traiter trop de sujets avec trop peu de moyens " : aussi quelques explications paraissent-elles nécessaires, sur ce point.

Il ne faudrait surtout pas imaginer que le fait d'essayer de choisir un thème fondamental de Recherche en fonction de la multiplicité de ses répercussions agronomiques possibles, signifie automatiquement que toutes ces ramifications vont être suivies en même temps, au prix d'un survol inefficace.

Chaque débouché sera éprouvé en son temps et en fonction de son opportunité, au terme d'une démarche " en profondeur " ; mais en cas d'insuccès dans un domaine particulier (parce qu'ainsi le voudrait la Nature) il sera possible, en utilisant les mêmes moyens, et en profitant de l'expérience acquise, d'opérer une réorientation rapide et faire oeuvre utile dans le cadre d'un autre problème agronomique d'importance immédiate.

Choisir une voie d'approche trop spécifique d'un seul objectif conduirait, par contre, au risque d'aboutir à terme à une IMPASSE, <u>quelle que soit, d'ailleurs, la réussite du projet</u>.

D'autre part, l'expérience montre qu'il est parfois nécessaire, au début, de procéder à une démarche expérimentale " en largeur " afin de pouvoir en extraire le fil conducteur capable de diriger avec le maximum de certitude, la Recherche vers son But. Cette étape ne doit pas, non plus, être confondue avec une " dispersion gratuite " des efforts.

Reste, enfin, la question posée récemment de la nécessité " d'adapter les Buts aux Moyens ou les Moyens aux Buts ". L'Histoire des Sciences montre que les Découvertes et les progrès de la Recherche ne sont pas indissolublement liés au coût (T.T.C.) du matériel d'équipement ni à la dimension de l'équipe (ce qui ne sous-entend pas qu'il faille pratiquer systématiquement la politique inverse !).

La solution de facilité consisterait, devant l'insuffisance des moyens, à choisir une démarche de routine et à l'exploiter à longueur d'années : il finirait toujours par en sortir quelque chose, mais la portée scientifique en souffrirait profondément. Or, les ambitions scientifiques d'une unité aussi spécialisée que le Laboratoire de Biochimie sont légitimes et inhérentes à son existence elle-même : le cas n'est pas unique puisque l'on peut noter dans le rapport justificatif des

.../...

demandes budgétaires présentées pour l'ensemble de l'INRA en 1974 (page 2) que le chercheur " enrage de n'avoir pas les moyens de ses ambitions ". Doit-il donc renoncer purement et simplement, ou persévérer, au contraire, et s'acharner à exploiter au maximum ses possibilités (en attendant que celles-ci s'améliorent — éventuellement — au fil du temps) ?

" Adapter les buts aux moyens " ne signifie donc pas, à mes yeux, renoncer à des projets jugés ambitieux, mais les aborder par la voie la plus efficacement adaptée aux moyens du moment.

Deuxième Partie

BILAN

et

PREVISIONS BUDGETAIRES

I- BILAN 1977

A- Equipement : néant.

B- Fonctionnement.

Budget prévu : 14 200 F.

Ce crédit n'ayant pas été versé, en pratique, les dépenses de 1977 ont encore été supportées par l'Apiculture. Elles se sont réparties comme suit :

Matériel de Laboratoire :.....	1 196,25	F. (T.T.C.)
Révision de Matériel :.....	240,00	
Ouvrages / documentation :.....	1 539,92	
Tirages CNRA/CNRS :.....	303,25	
Frais de Tirages à part des publ. du Laboratoire :.....	692,50	
Fournitures de Bureau :.....	918,91	
Missions :.....	1 077,50	
Affranchissement PTT :.....	449,65	(chrono : n°1 à 374).
Total :	6 817,98	F. (T.T.C.).

II- PREVISIONS 1978

A- Equipement

La demande totale (regroupant 1976-77-78) représente une somme de 50 000 F (soit 17 000 F par an, théoriquement). Les éléments justificatifs ont été adressés au Département le 9/9/77.

1ère Urgence :	Trébuchet au 10^{-2}g Portée 1,6 Kg	: 5 500
	Balance au 10^{-2}mg Portée 160 g	: 12 000
	Mach. à Calculer Progr./Cartes magnét.	: 3 500
	App. de Nettoyage/Générateur Ultra-sons	: 6 500
	Ensemble de Reproduction " Polaroïd "	: 7 500
2ème Urgence :	Agitateurs magnétiques	: 2 000
3ème Urgence :	Groupe électrogène de Secours	: 13 000

B- Fonctionnement

Attribution initiale 16 000 F.

N° Codique du Laboratoire : AVIGNON-BIOCHIMIE 21-291.

Répartition initiale :

634-1 - Matériel de Laboratoire :....4 500
" - Produits chimiques :.....3 000
" - Xérocopies :.....1 000
" - Fournitures diverses :.....2 000
634-3 - Documentation :.....3 500
641-1 - Déplacements :.....1 500
634-4 - P et T (Affranchissement) :.. 500.

III- RECAPITULATIF D'ENSEMBLE

Années	Equipement	Fonctionnement	Total
1972	5 602,17	2 722,71	8 324,88
1973	51 553,20	21 322,81	72 876,01
1974	25 514,00	9 325,19	34 839,91
1975	12 784,00	8 325,55	21 109,55
1976	0,00	7 834,31	7 834,31
1977	0,00	6 817,98	6 817,98

AVIGNON - Montfavet, le 9/1/78.

Michel BOUNIAS
Docteur ès Sciences